

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005337

International filing date: 24 March 2005 (24.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-091653  
Filing date: 26 March 2004 (26.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 30 June 2005 (30.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 2 6 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 9 1 6 5 3

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号  
J P 2 0 0 4 - 0 9 1 6 5 3  
The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

出 願 人  
Applicant(s): 大日本印刷株式会社

2 0 0 5 年 6 月 1 5 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



|           |                               |
|-----------|-------------------------------|
| 【書類名】     | 特許願                           |
| 【整理番号】    | B0H00046                      |
| 【提出日】     | 平成16年 3月26日                   |
| 【あて先】     | 特許庁長官殿                        |
| 【国際特許分類】  | G02B 5/20                     |
| 【発明者】     |                               |
| 【住所又は居所】  | 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号 大日本印刷株式会社内 |
| 【氏名】      | 服部 秀志                         |
| 【発明者】     |                               |
| 【住所又は居所】  | 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号 大日本印刷株式会社内 |
| 【氏名】      | 三宅 秀之                         |
| 【発明者】     |                               |
| 【住所又は居所】  | 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号 大日本印刷株式会社内 |
| 【氏名】      | 小林 弘典                         |
| 【特許出願人】   |                               |
| 【識別番号】    | 000002897                     |
| 【氏名又は名称】  | 大日本印刷株式会社                     |
| 【代表者】     | 北島 義俊                         |
| 【代理人】     |                               |
| 【識別番号】    | 100101203                     |
| 【弁理士】     |                               |
| 【氏名又は名称】  | 山下 昭彦                         |
| 【電話番号】    | 03-5524-2323                  |
| 【選任した代理人】 |                               |
| 【識別番号】    | 100104499                     |
| 【弁理士】     |                               |
| 【氏名又は名称】  | 岸本 達人                         |
| 【電話番号】    | 03-5524-2323                  |
| 【手数料の表示】  |                               |
| 【予納台帳番号】  | 131924                        |
| 【納付金額】    | 21,000円                       |
| 【提出物件の目録】 |                               |
| 【物件名】     | 特許請求の範囲 1                     |
| 【物件名】     | 明細書 1                         |
| 【物件名】     | 図面 1                          |
| 【物件名】     | 要約書 1                         |
| 【包括委任状番号】 | 0105701                       |

## 【書類名】 特許請求の範囲

### 【請求項 1】

基材上に、遮光部および、前記遮光部を覆うように、細胞と接着性を有し、かつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層を形成し、パターンニング用基板とするパターンニング用基板形成工程と、

前記パターンニング用基板に前記基材側からエネルギーを照射し、前記細胞接着材料が分解または変性された細胞接着阻害部と、前記細胞接着阻害部以外の細胞接着部とからなるパターンを形成するエネルギー照射工程と、

細胞および培養液を含有する細胞培養液中で、前記細胞接着部に前記細胞を接着させる細胞接着工程と

を有することを特徴とする細胞培養基板の製造方法。

### 【請求項 2】

前記細胞接着層が、光触媒および前記細胞接着材料を含有する光触媒含有細胞接着層であることを特徴とする請求項 1 に記載の細胞培養基板の製造方法。

### 【請求項 3】

前記パターンニング用基板形成工程が、前記基材上に、少なくとも光触媒を含有する光触媒含有層および前記遮光部を形成し、前記光触媒含有層上に前記細胞接着層を形成し、パターンニング用基板とする工程であることを特徴とする請求項 1 に記載の細胞培養基板の製造方法。

### 【請求項 4】

前記細胞接着工程中に、前記細胞接着阻害部にエネルギーを照射することを特徴とする請求項 1 から請求項 3 までのいずれかの請求項に記載の細胞培養基板の製造方法。

### 【請求項 5】

前記細胞接着工程後に、前記細胞接着阻害部に前記基材側からエネルギーを照射することにより、前記細胞接着部に接着した前記細胞のパターンを維持する細胞パターン維持工程を行うことを特徴とする請求項 1 から請求項 4 までのいずれかの請求項に記載の細胞培養基板の製造方法。

### 【請求項 6】

基板を支持する基板支持部と、前記細胞および培養液を含有する細胞培養液を保持し、かつ前記細胞培養液の pH を保持する pH 調整手段、および前記細胞培養液の温度を維持する温度調整手段を有する細胞培養液保持部と、前記基板にエネルギーを照射するエネルギー照射部とを有することを特徴とする細胞培養基板製造装置。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞培養基板の製造方法および細胞培養基板製造装置

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞を高精細なパターン状に接着させた細胞培養基板の製造方法、および細胞培養基板の製造に用いられる装置に関するものである。

【背景技術】

【0002】

現在、いろいろな動物や植物の細胞培養が行われており、また、新たな細胞の培養法が開発されている。細胞培養の技術は、細胞の生化学的現象や性質の解明、有用な物質の生産などの目的で利用されている。さらに、培養細胞を用いて、人工的に合成された薬剤の生理活性や毒性を調べる試みがなされている。

【0003】

一部の細胞、特に多くの動物細胞は、何かに接着して生育する接着依存性を有しており、生体外の浮遊状態では長期間生存することができない。このような接着依存性を有した細胞の培養には、細胞が接着するための担体が必要であり、一般的には、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞接着性タンパク質を均一に塗布したプラスチック製の培養皿が用いられている。これらの細胞接着性タンパク質は、培養細胞に作用し、細胞の接着を容易にしたり、細胞の形態に影響を与えることが知られている。

【0004】

一方、培養細胞を基材上の微小な部分にのみ接着させ、配列させる技術が報告されている。このような技術により、培養細胞を人工臓器やバイオセンサ、バイオリアクターなどに応用することが可能になる。培養細胞を配列させる方法としては、細胞に対して接着の容易さが異なるような表面がパターンをなしているような基材を用い、この表面で細胞を培養し、細胞が接着するように加工した表面だけに細胞を接着させることによって細胞を配列させる方法がとられている。

【0005】

例えば、特許文献1には、回路状に神経細胞を増殖させるなどの目的で、静電荷パターンを形成させた電荷保持媒体を細胞培養に応用している。また、特許文献2では、細胞非接着性あるいは細胞接着性の光感受性親水性高分子をフォトリソグラフィ法によりパターンニングした表面上への培養細胞の配列を試みている。

【0006】

さらに、特許文献3では、細胞の接着率や形態に影響を与えるコラーゲンなどの物質がパターンニングされた細胞培養用基材と、この基材をフォトリソグラフィ法によって作製する方法について開示している。このような基材の上で細胞を培養することによって、コラーゲンなどがパターンニングされた表面により多くの細胞を接着させ、細胞のパターンニングを実現している。

【0007】

しかしながら、このような細胞培養部位のパターンニングは、用途によっては高精細であることが要求される場合がある。上述したような感光性材料を用いたフォトリソグラフィ法等によるパターンニングを行う場合は、高精細なパターンを得ることはできるが、細胞接着性材料が感光性を有する必要があるとあり、例えば生体高分子等にこのような感光性を付与するための化学的修飾を行うことが困難な場合が多く、細胞接着性材料の選択性の幅を極めて狭くするといった問題があった。また、フォトレジストを用いたフォトリソグラフィ法では、現像液等を用いる必要性があり、これらが細胞培養に際して悪影響を及ぼす場合があった。

【0008】

さらに、高精細な細胞接着性材料のパターンの形成方法として、マイクロ・コンタクトプリンティング法が、ハーバード大学のジョージ M. ホワイトサイズ (George M. Whitesides) により提唱されている (例えば、特許文献4、特許文献5、特許文献6、特許文献

7等)。しかしながら、この方法を用いて工業的に細胞接着性材料のパターンを有する細胞培養基材を製造することは難しいといった問題があった。

【0009】

また、細胞パターンを維持しながら、細胞の機能分化や異種細胞との積層共培養による細胞集合体の機能化などを実現することができれば、細胞組織工学分野において意義深い。しかしながら、一般に、長期間培養しながら細胞パターンを維持することは困難である。これは、時間とともに細胞接着阻害部表面に培養細胞が分泌するタンパク質などが徐々に吸着し、それによって細胞接着阻害部表面が細胞接着性を有するようになるからである。

【0010】

【特許文献1】特開平2-245181号公報

【特許文献2】特開平3-7576号公報

【特許文献3】特開平5-176753号公報

【特許文献4】米国特許第5,512,131号公報

【特許文献5】米国特許第5,900,160号公報

【特許文献6】特開平9-240125号公報

【特許文献7】特開平10-12545号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

そこで、基材上に細胞を高精細なパターン状に接着し、長期にわたりパターンを維持しながら細胞を培養させるために用いられる細胞培養基板の新たな製造方法、およびその製造方法に用いられる製造装置の提供が望まれている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、基材上に、遮光部および、上記遮光部を覆うように、細胞と接着性を有し、かつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層を形成し、パターンニング用基板とするパターンニング用基板形成工程と、

上記パターンニング用基板に上記基材側からエネルギーを照射し、上記細胞接着材料が分解または変性された細胞接着阻害部と、上記細胞接着阻害部以外の細胞接着部とからなるパターンを形成するエネルギー照射工程と、

細胞および培養液を含有する細胞培養液中で、上記細胞接着部に上記細胞を接着させる細胞接着工程と

を有することを特徴とする細胞培養基板の製造方法を提供する。

【0013】

本発明によれば、上記エネルギー照射工程により、上記細胞接着部および細胞接着阻害部が形成されていることから、上記細胞接着工程において、細胞培養液に細胞接着層を浸すこと等によって、細胞接着部のみに細胞を接着させることができ、細胞培養液中で高精細なパターン状に細胞を培養することができる。また本発明においては、上記パターンニング用基板形成工程において、上記遮光部および上記細胞接着層を有するパターンニング用基板を形成することから、エネルギー照射工程において、基材側から全面にエネルギーを照射することによって、遮光部が形成されていない領域のみ細胞接着材料が分解または変性された細胞接着阻害部とすることもでき、効率よく高精細に細胞接着部および細胞接着阻害部からなるパターンを形成することができる。

【0014】

上記発明においては、上記細胞接着層が、光触媒および上記細胞接着材料を含有する光触媒含有細胞接着層としてもよい。この場合、上記エネルギー照射工程においてエネルギーを照射することにより、光触媒含有細胞接着層自体に含有される光触媒が励起されて、細胞接着材料を分解または変性させることができる。したがって、別途光触媒を含有する層等を形成する必要がなく、製造効率よく細胞培養基板を製造することができる。

#### 【0015】

また、上記発明においては、上記パターンニング用基板形成工程が、上記基材上に、少なくとも光触媒を含有する光触媒含有層および上記遮光部を形成し、上記光触媒含有層上に上記細胞接着層を形成し、パターンニング用基板とする工程とすることもできる。この場合、上記細胞接着層が光触媒含有層上に形成されていることから、細胞接着工程において、細胞を細胞接着部に接着させた際、細胞が直接光触媒と接触する可能性が低く、経時で細胞が光触媒の影響を受けるおそれが少ない細胞培養基板を製造することができる。

#### 【0016】

また、上記発明においては、上記細胞接着工程中に、上記細胞接着阻害部にエネルギーを照射することもできる。これにより、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって上記細胞接着阻害部の細胞との接着性をより低いものとすることができ、細胞接着阻害部に細胞が付着することをより防止することができる。

#### 【0017】

またさらに、上記発明においては、上記細胞接着工程後に、上記細胞接着阻害部に上記基材側からエネルギーを照射することにより、上記細胞接着部に接着した上記細胞のパターンを維持する細胞パターン維持工程を行ってもよい。これにより、培養された細胞が、上記細胞接着阻害部に付着した場合であっても、細胞接着阻害部上の細胞をエネルギー照射に伴う光触媒の作用により除去することができ、高精細なパターン状に細胞を維持することができるからである。

#### 【0018】

また、本発明は、基板を支持する基板支持部と、上記細胞および培養液を含有する細胞培養液を保持し、かつ上記細胞培養液のpHを維持するpH調整手段および上記細胞培養液の温度を維持する温度調整手段を有する細胞培養液保持部と、上記基板にエネルギーを照射するエネルギー照射部とを有することを特徴とする細胞培養基板製造装置を提供する。

#### 【0019】

本発明によれば、上記細胞培養基板製造装置が、上記細胞培養液保持部、基板支持部、およびエネルギー照射部を有することから、細胞培養液中で細胞を培養する際、基板の細胞を培養する領域以外の領域に付着したたんばく質や細胞をエネルギー照射により除去すること等ができ、高精細なパターン状に細胞が培養された細胞培養基板を製造することが可能な、細胞培養基板製造装置とすることができる。

#### 【発明の効果】

#### 【0020】

本発明によれば、細胞培養液中で、高精細なパターン状に細胞が培養された細胞培養基板を製造することができ、長期に渡り細胞パターンを維持しながら細胞を培養することができるものとすることができる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0021】

本発明は、細胞を高精細なパターン状に接着させた細胞培養基板の製造方法、および細胞培養基板の製造に用いられる装置に関するものである。以下、それぞれについてわけて説明する。

#### 【0022】

##### A. 細胞培養基板の製造方法

まず、本発明の細胞培養基板の製造方法について説明する。本発明の細胞培養基板の製造方法は、基材上に、遮光部および、上記遮光部を覆うように、細胞と接着性を有し、かつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層を形成し、パターンニング用基板とするパターンニング用基板形成工程と、

上記パターンニング用基板に上記基材側からエネルギーを照射し、上記細胞接着材料が分解または変性された細胞接着阻害部と、上記細胞接着阻害部以外の細胞接着部とからなるパターンを形成するエネルギー照射工程と、

細胞および培養液を含有する細胞培養液中で、上記細胞接着部に上記細胞を接着させる細胞接着工程と

を有することを特徴とするものである。

#### 【0023】

本発明によれば、上記エネルギー照射工程において、細胞接着層に細胞接着部および細胞接着阻害部からなるパターンが形成されることから、上記細胞接着工程において、この細胞接着層を細胞培養液に浸すこと等によって、容易に細胞接着部のみに細胞を接着させることができ、細胞培養液中で目的とするパターン状に細胞を培養することができるのである。また、本発明においては、上記細胞接着工程中や、細胞接着工程後、上記細胞接着阻害部に上記基材側からエネルギー照射をすることによって、細胞接着阻害部に付着したたんばく質や細胞を除去すること等もでき、高精細なパターン状に細胞を培養することができる。

#### 【0024】

また、本発明によれば、上記パターニング用基板形成工程において、細胞培養層と基材の間に、遮光部が形成されることから、エネルギー照射工程において、基材側から全面にエネルギーを照射することにより、遮光部が形成されていない領域のみの細胞接着材料を分解することができ、容易に高精細なパターン状に細胞接着部および細胞接着阻害部を形成することができる。

#### 【0025】

ここで、本発明においては、上記パターニング用基板の構成や、エネルギー照射工程におけるエネルギーの照射方法等により、2つの実施態様がある。以下、それぞれの実施態様ごとに詳しく説明する。

#### 【0026】

##### 1. 第1実施態様

まず、本発明の細胞培養基板の製造方法の第1実施態様について説明する。本発明の細胞培養基板の製造方法は、基材上に、遮光部および、上記遮光部を覆うように、細胞と接着性を有し、かつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層を形成し、パターニング用基板とするパターニング用基板形成工程と、

上記パターニング用基板に上記基材側からエネルギーを照射し、上記細胞接着材料が分解または変性された細胞接着阻害部と、上記細胞接着阻害部以外の細胞接着部とからなるパターンを形成するエネルギー照射工程と、

細胞および培養液を含有する細胞培養液中で、上記細胞接着部に上記細胞を接着させる細胞接着工程と

を有するものであり、上記細胞接着層が、光触媒および上記細胞接着材料を含有する光触媒含有細胞接着材料とされるものである。

#### 【0027】

本実施態様によれば、例えば図1に示すように、まず、基材1上に遮光部2を形成し、その遮光部2を覆うように、光触媒および細胞接着材料を含有する光触媒含有細胞接着層3を形成してパターニング用基板を形成するパターニング用基板形成工程を行う（図1（a））。続いて、上記パターニング用基板の基材1側からエネルギー4を照射し（図1（b））、細胞接着材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性されて細胞との接着性が低下した細胞接着阻害部5と、エネルギー4が未照射の領域であり、細胞との接着性が良好な細胞接着部6とからなるパターンを形成する（図1（c））エネルギー照射工程を行う。次に、細胞および培養液を含有する細胞培養液7中で、上記細胞接着部6に細胞8を接着させる細胞接着工程（図1（d））を行い、細胞接着部6のみに高精細に細胞8が接着された細胞培養基板が製造されるのである。

#### 【0028】

本実施態様においては、上記光触媒含有細胞接着層が、光触媒および細胞接着材料を含有することから、エネルギー照射工程等においてエネルギーを照射する際、上記光触媒含



有細胞接着層自体に含有される光触媒の作用により、細胞接着材料を分解または変性させることができ、別途光触媒を含有する層等を形成する必要等がなく、細胞培養基板の製造効率が良いものとすることができる。

#### 【0029】

以下、本実施態様の細胞培養基板の製造方法における各工程ごとに説明する。

#### 【0030】

##### (1) パターニング用基板形成工程

まず、本実施態様におけるパターニング用基板形成工程について説明する。本実施態様におけるパターニング用基板形成工程は、基材上に、遮光部および、上記遮光部を覆うように、細胞と接着性を有し、かつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料と光触媒とを含有する光触媒含有細胞接着層を形成し、パターニング用基板とする工程である。

#### 【0031】

本工程は、基材上に遮光部および光触媒含有細胞接着層を形成することが可能であれば、それぞれの部材の形成方法等は特に限定されるものではなく、例えば基材上に遮光部を形成し、その後、光触媒および細胞接着材料を含有する光触媒含有細胞接着層形成用塗工液等を塗布する工程等とすることができる。

以下、本工程により形成されるパターニング用基板の各構成ごとに説明する。

#### 【0032】

##### (光触媒含有細胞接着層)

まず、本工程において形成される光触媒含有細胞接着層について説明する。本工程において形成される光触媒含有細胞接着層は、後述する基材上に、後述する遮光部を覆うように形成されるものであり、光触媒および細胞接着材料を含有するものである。

#### 【0033】

本工程においては、このような層が形成可能であれば、その形成方法等は特に限定されるものではなく、例えば、光触媒および上記細胞接着材料を含有する光触媒含有細胞接着層形成用塗工液を、スピコート法、スプレーコート法、ディップコート法、ロールコート法、ビードコート法、ダイコート法等の湿式法によって塗布すること等により、形成することができる。このような光触媒含有細胞接着層の膜厚としては、細胞培養基板の種類等によって適宜選択されるものであるが、通常 $0.01\mu\text{m}\sim 1.0\mu\text{m}$ 程度、中でも $0.1\mu\text{m}\sim 0.3\mu\text{m}$ 程度とすることができる。

#### 【0034】

以下、上記光触媒含有細胞接着層に用いられる各材料について説明する。

#### 【0035】

##### a. 細胞接着材料

まず、本工程において形成される光触媒含有細胞接着層に用いられる細胞接着材料について説明する。本工程において用いられる細胞接着材料は、細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性されるものであれば、その種類等は特に限定されるものではない。ここで、細胞と接着性を有するとは、細胞と良好に接着することをいい、細胞との接着性が細胞の種類によって異なる場合等には、目的とする細胞と良好に接着することをいう。

#### 【0036】

本工程に用いられる細胞接着材料は、このような細胞との接着性を有しており、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって分解または変性されて、細胞との接着性を有しなくなるものや、細胞との接着を阻害する細胞接着阻害性を有するものに変化するもの等が用いられる。

#### 【0037】

ここで、上記のような細胞と接着性を有する材料には、物理化学的特性により細胞と接着性を有する材料と、生物化学的特性により細胞と接着性を有する材料との2種類がある。

### 【0038】

物理化学的特性により細胞と接着性を有する材料の、細胞との接着性を決定する物理化学的な因子としては、表面自由エネルギーや、静電相互作用等が挙げられる。例えば細胞との接着性が材料の表面自由エネルギーにより決定される場合には、材料が所定の範囲内の表面自由エネルギーを有すると細胞と材料との接着性が良好となり、その範囲を外れると細胞と材料との接着性が低下することとなる。このような表面自由エネルギーによる細胞の接着性の変化としては、例えば資料CMC出版 バイオマテリアルの最先端 篠 義人（監修）p. 109下部に示されるような実験結果が知られている。このような因子により細胞との接着性を有する材料としては、例えば親水化ポリスチレン、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）等が挙げられる。このような材料を用いた場合、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、例えば上記材料の表面の官能基が置換等されたり、分解されること等によって、表面自由エネルギーが変化し、細胞との接着性を有しないもの、または細胞接着阻害性を有するものとすることができる。

### 【0039】

また、静電相互作用等により細胞と材料との接着性が決定される場合、例えば材料が有する正電荷の量等によって細胞との接着性が決定されることとなる。このような静電相互作用により細胞との接着性を有する材料としては、例えばポリリジン等の塩基性高分子、アミノプロピルトリエトキシシラン、N-（2-アミノエチル）-3-アミノプロピルトリメトキシシラン等の塩基性化合物およびそれらを含む縮合物等が挙げられる。このような材料を用いた場合、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記材料が分解または変性されることによって、例えば表面に存在する正電荷量を変化させることができ、細胞との接着性を有しないもの、または細胞接着阻害性を有するものとすることができる。

### 【0040】

また、生物学的特性により細胞と接着性を有する材料としては、特定の細胞と接着性が良好なもの、または多くの細胞と接着性が良好なもの等が挙げられ、具体的には、フィブロネクチン、ラミニン、テネイシン、ビトロネクチン、RGD（アルギニン-グリシン-アスパラギン酸）配列含有ペプチド、YIGSR（チロシン-イソロイシン-グリシン-セリン-アルギニン）配列含有ペプチド、コラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン等が挙げられる。このような材料を用いた場合、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、例えば上記材料の構造の一部を破壊したり、主鎖を破壊すること等によって、細胞との接着性を有しないもの、または細胞接着阻害性を有するものとすることができる。

### 【0041】

このような細胞接着材料は、上記材料の種類等によって異なるものであるが、光触媒含有細胞接着層中に通常0.01重量%～95重量%、中でも1重量%～10重量%含有されることが好ましい。これにより、細胞接着材料を含有する領域を細胞との接着性が良好な領域とすることができるからである。

### 【0042】

#### b. 光触媒

次に、本工程において形成される光触媒含有細胞接着層に含有される光触媒について説明する。本工程に用いられる光触媒は、上述した細胞接着材料を、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって分解または変性させることが可能なものであれば、特に限定されるものではない。

### 【0043】

ここで、後述するような酸化チタンに代表される光触媒の作用機構は、必ずしも明確なものではないが、光の照射によって生成したキャリアが、近傍の化合物との直接反応、あるいは、酸素、水の存在下で生じた活性酸素種によって、有機物の化学構造に変化を及ぼすものと考えられている。本実施態様においては、後述するエネルギー照射工程において、このキャリアが上述した細胞接着材料に作用を及ぼすものであると思われる。

### 【0044】

本実施態様に用いられる光触媒として、具体的には、光半導体として知られる例えば二

酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ )、酸化亜鉛 ( $\text{ZnO}$ )、酸化スズ ( $\text{SnO}_2$ )、チタン酸ストロンチウム ( $\text{SrTiO}_3$ )、酸化タングステン ( $\text{WO}_3$ )、酸化ビスマス ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ )、および酸化鉄 ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) を挙げることができ、これらから選択して1種または2種以上を混合して用いることができる。

#### 【0045】

本実施態様においては、特に二酸化チタンが、バンドギャップエネルギーが高く、化学的に安定で毒性もなく、入手も容易であることから好適に使用される。二酸化チタンには、アナターゼ型とルチル型があり本実施態様ではいずれも使用することができるが、アナターゼ型の二酸化チタンが好ましい。アナターゼ型二酸化チタンは励起波長が380nm以下にある。

#### 【0046】

このようなアナターゼ型二酸化チタンとしては、例えば、塩酸解膠型のアナターゼ型チタニアゾル (石原産業 (株) 製STS-02 (平均粒径7nm)、石原産業 (株) 製ST-K01)、硝酸解膠型のアナターゼ型チタニアゾル (日産化学 (株) 製TA-15 (平均粒径12nm)) 等を挙げることができる。

#### 【0047】

光触媒の粒径は小さいほど光触媒反応が効果的に起こるので好ましく、平均粒径が50nm以下が好ましく、20nm以下の光触媒を使用するのが特に好ましい。

#### 【0048】

また、上記酸化チタンとして可視光応答型のものを用いてもよい。可視光応答型の酸化チタンとは、可視光のエネルギーによっても励起されるものであり、このような可視光応答化の方法としては、酸化チタンを窒化処理する方法等が挙げられる。

#### 【0049】

酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ ) は、窒化処理をすることにより、酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ ) のバンドギャップの内側に新しいエネルギー準位が形成され、バンドギャップが狭くなる。その結果、通常酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ ) の励起波長は380nmであるが、その励起波長より長波長の可視光によっても、励起されることが可能となるのである。これにより、種々の光源によるエネルギー照射の可視光領域の波長も酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ ) の励起に寄与させることが可能となることから、さらに酸化チタンを高感度化させることが可能となるのである。

#### 【0050】

ここで、本実施態様でいう酸化チタンの窒化処理とは、酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ ) の結晶の酸素サイトの一部を窒素原子での置換する処理や、酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ ) 結晶の格子間に窒素原子をドーピングする処理、または酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ ) 結晶の多結晶集合体の粒界に窒素原子を配する処理等をいう。

#### 【0051】

酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ ) の窒化処理方法は、特に限定されるものではなく、例えば、結晶性酸化チタンの微粒子をアンモニア雰囲気下で700℃の熱処理により、窒素をドーピングし、この窒素のドーピングされた微粒子と、無機バインダや溶媒等を用いて、分散液とする方法等が挙げられる。

#### 【0052】

本実施態様により形成される光触媒含有細胞接着層中に含有される光触媒の量は、5～95重量%、好ましくは10～60重量%、さらに好ましくは20～40重量%の範囲で設定することができる。これにより、後述するエネルギー照射工程において、エネルギーが照射された領域の光触媒含有細胞接着層の細胞接着材料を分解または変性することが可能となるからである。

#### 【0053】

ここで、本実施態様に用いられる光触媒は、細胞との接着性が低いものであることが好ましい。これにより、上述した細胞接着材料が分解等されて光触媒が露出した領域を、細胞との接着性が低い領域として用いることが可能となるからである。

# 【0054】

## c. その他

本実施態様においては、形成される光触媒含有細胞接着層中に、上記細胞接着材料や光触媒だけでなく、必要に応じて例えば、強度や耐性等を向上させるバインダ等を含有するものであってもよい。本実施態様においては、特にバインダとして、少なくとも後述するエネルギー照射工程後に、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有する材料が用いられることが好ましい。これにより、後述するエネルギー照射工程においてエネルギーが照射された領域である細胞接着阻害部の細胞との接着性を低いものとすることができるからである。このような材料としては、例えばエネルギー照射される前から上記細胞接着阻害性を有するものであってもよく、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞接着阻害性を有するものとなるものであってもよい。

# 【0055】

本実施態様においては、特にエネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞接着阻害性を有するものとなる材料をバインダとして用いることが好ましい。これにより、エネルギー照射される前の領域においては、上記細胞接着材料の細胞との接着性を阻害することがなく、エネルギー照射された領域のみを、細胞との接着性が低いものとすることができるからである。

# 【0056】

このようなバインダとして用いられる材料としては、例えば主骨格が上記の光触媒の光励起により分解されないような高い結合エネルギーを有するものであって、光触媒の作用により分解されるような有機置換基を有するものが好ましく、例えば、(1)ゾルゲル反応等によりクロロまたはアルコキシシラン等を加水分解、重縮合して大きな強度を発揮するオルガノポリシロキサン、(2)撥水性や撥油性に優れた反応性シリコーンを架橋したオルガノポリシロキサン等を挙げることができる。

# 【0057】

上記の(1)の場合、一般式：



(ここで、Yはアルキル基、フルオロアルキル基、ビニル基、アミノ基、フェニル基もしくはエポキシ基、またはこれらを含む有機基であり、Xはアルコキシ基、アセチル基またはハロゲンを示す。nは0～3までの整数である。)

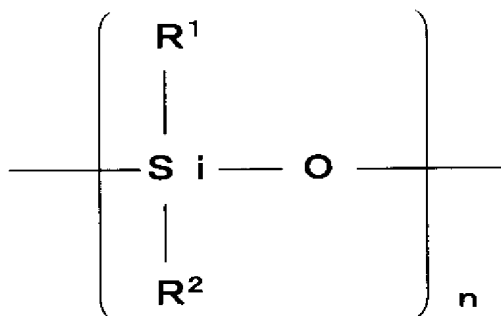
で示される珪素化合物の1種または2種以上の加水分解縮合物もしくは共加水分解縮合物であるオルガノポリシロキサンであることが好ましい。なお、ここでYで示される有機基の炭素数は1～20の範囲内であることが好ましく、また、Xで示されるアルコキシ基は、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基であることが好ましい。

# 【0058】

また、上記の(2)の反応性シリコーンとしては、下記一般式で表される骨格をもつ化合物を挙げることができる。

# 【0059】

## 【化1】



#### 【0060】

ただし、 $n$ は2以上の整数であり、 $R^1$ 、 $R^2$ はそれぞれ炭素数1～20の置換もしくは非置換のアルキル、アルケニル、アリールあるいはシアノアルキル基であり、モル比で全体の40%以下がビニル、フェニル、ハロゲン化フェニルである。また、 $R^1$ 、 $R^2$ がメチル基のものが表面エネルギーが最も小さくなるので好ましく、モル比でメチル基が60%以上であることが好ましい。また、鎖末端もしくは側鎖には、分子鎖中に少なくとも1個以上の水酸基等の反応性基を有する。上記のような材料を用いることによって、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、エネルギー照射された領域の表面を高い親水性を有するものとすることができる。これにより、細胞との接着が阻害され、エネルギー照射された領域には細胞が接着しないものとすることができるからである。

#### 【0061】

上記材料を細胞接着阻害材料として用いる場合、エネルギーが照射される前の水との接触角が $15^\circ \sim 120^\circ$ 、中でも $20^\circ \sim 100^\circ$ の範囲内となるものであることが好ましい。これにより、上記細胞接着材料の細胞との接着性を阻害することのないものとすることができるからである。

#### 【0062】

また、この細胞接着阻害材料にエネルギーが照射された場合には、水との接触角が $10^\circ$ 以下となるものであることが好ましい。上記範囲とすることにより、高い親水性を有するものとすることができ、細胞との接着性を低いものとすることができるからである。

#### 【0063】

なお、ここでいう水との接触角は、水、もしくは同等の接触角を有する液体との接触角を接触角測定器（協和界面科学（株）製C A-Z型）を用いて測定（マイクロシリッジから液滴を滴下して30秒後）し、その結果から、もしくはその結果をグラフにして得たものである。

#### 【0064】

また、上記のオルガノポリシロキサンとともに、ジメチルポリシロキサンのような架橋反応をしない安定なオルガノシリコン化合物をバインダに混合してもよい。

#### 【0065】

また、本実施態様においては、エネルギーが照射された領域の濡れ性の変化を起こさせること等により、細胞との接着性が低下する、もしくはそのような変化を補助する分解物質等を含むものであってもよい。

#### 【0066】

このような分解物質としては、例えばエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解等されて、親水性となること等により、細胞との接着性が低下する界面活性剤等を挙げることができる。具体的には、日光ケミカルズ（株）製N I K K O L B L、B C、B O、B Bの各シリーズ等の炭化水素系、デュボン社製Z O N Y L F S N、F S O、旭硝子（株）製サーフロンS-141、145、大日本インキ化学工業（株）製メガファックF-141、144、ネオス（株）製フタージェントF-200、F251、ダイキン工業（株）製ユニダインD S-401、402、スリーエム（株）製フロラードF C-170、176等のシリコン系の非イオン界面活性剤を挙げることができ、また、カチオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤、両性界面活性剤を用いることもできる。

#### 【0067】

また、界面活性剤の他にも、ポリビニルアルコール、不飽和ポリエステル、アクリル樹脂、ポリエチレン、ジアリルフタレート、エチレンプロピレンジエンモノマー、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、ポリウレタン、メラミン樹脂、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニル、ポリアミド、ポリイミド、スチレンブタジエンゴム、クロロプレンゴム、ポリプロピレン、ポリブチレン、ポリスチレン、ポリ酢酸ビニル、ナイロン、ポリエステル、ポリブタジエン、ポリベンズイミダゾール、ポリアクリルニトリル、エピクロロヒドリン、ポリサルファイド、ポリイソプレン等のオリゴマー、ポリマー等を挙げることができる。

#### 【0068】

本実施態様においては、このようなバインダは、光触媒含有細胞接着層中に5重量%～95重量%、中でも40重量%～90重量%、特に60重量%～80重量%の範囲内含有されることが好ましい。

#### 【0069】

(遮光部)

次に、本工程において形成される遮光部について説明する。本工程において形成される遮光部は、上記光触媒含有細胞接着層と、後述する基材との間に設けられるものであれば、その形状等は特に限定されるものではなく、例えば、後述するエネルギー照射工程において、細胞接着部とされる領域、すなわち最終的には細胞が培養される領域に形成されるものとすることができる。本実施態様においては、上記基材と光触媒含有細胞接着層との間に、遮光部が形成されていることから、後述するエネルギー照射工程において、エネルギーが全面に照射された場合であっても、遮光部が形成された領域上の光触媒含有細胞接着層にはエネルギーが照射されず、この領域の細胞接着材料が分解されないものとすることができるのである。

#### 【0070】

このような遮光部は、後述するエネルギー照射工程において照射されるエネルギーを遮蔽することが可能なものであれば、特にその形成方法等は限定されるものではなく、例えばスパッタリング法、真空蒸着法等により厚み1000～2000Å程度のクロム等の金属薄膜を形成し、この薄膜をパターニングすることにより形成されてもよい。このパターニングの方法としては、スパッタ等の通常のパターニング方法を用いることができる。

#### 【0071】

また、樹脂バインダ中にカーボン微粒子、金属酸化物、無機顔料、有機顔料等の遮光性粒子を含有させた層をパターン状に形成する方法であってもよい。用いられる樹脂バインダとしては、ポリイミド樹脂、アクリル樹脂、エポキシ樹脂、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ゼラチン、カゼイン、セルロース等の樹脂を1種または2種以上混合したものや、感光性樹脂、さらにはO/Wエマルジョン型の樹脂組成物、例えば、反応性をエマルジョン化したもの等を用いることができる。このような樹脂製遮光部の厚みとしては、0.5～10μmの範囲内で設定することができる。このような樹脂製遮光部のパターニングの方法は、フォトリソ法、印刷法等一般的に用いられている方法を用いることができる。

#### 【0072】

なお、上記遮光部は、基材の光触媒含有細胞接着層が形成される側の面に形成されるものであってもよく、また反対側の面に形成されるものであってもよい。

#### 【0073】

また、上記遮光部を形成する場合には、上記光触媒含有細胞接着層と遮光部との間にプライマー層を形成してもよい。このプライマー層の作用・機能は必ずしも明確なものではないが、プライマー層を形成することにより、光触媒の作用による光触媒含有細胞接着層中の細胞接着材料の分解または変性を阻害する要因となる遮光部および遮光部間に存在する開口部からの不純物、特に、遮光部をパターニングする際に生じる残渣や、金属、金属イオン等の不純物の拡散を防止する機能を示すものと考えられる。したがって、プライマー層を形成することにより、後述するエネルギー照射工程で、高感度で細胞接着材料を分解または変性させることができ、その結果、細胞接着部と細胞接着阻害部とを、高精細なパターン状に形成することができるのである。

#### 【0074】

なお、本実施態様においてプライマー層は、遮光部のみならず遮光部間に形成された開口部に存在する不純物が光触媒の作用に影響することを防止するものであるので、プライマー層は開口部を含めた遮光部全面にわたって形成されていることが好ましい。

#### 【0075】

本実施態様におけるプライマー層は、上記遮光部と上記光触媒含有細胞接着層とが接触しないようにプライマー層が形成された構造であれば特に限定されるものではない。

#### 【0076】

このプライマー層を構成する材料としては、特に限定されるものではないが、光触媒の作用により分解されにくい無機材料が好ましい。具体的には無定形シリカを挙げることができる。このような無定形シリカを用いる場合には、この無定形シリカの前駆体は、一般式 $\text{SiX}_4$ で示され、Xはハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、またはアセチル基等であるケイ素化合物であり、それらの加水分解物であるシラノール、または平均分子量3000以下のポリシロキサンが好ましい。

#### 【0077】

また、プライマー層の膜厚は、 $0.001\mu\text{m}$ から $1\mu\text{m}$ の範囲内であることが好ましく、特に $0.001\mu\text{m}$ から $0.1\mu\text{m}$ の範囲内であることが好ましい。

#### 【0078】

##### (基材)

次に、本工程により形成されるパターンニング用基板に用いられる基材について説明する。本工程に用いられる基材としては、上記光触媒含有細胞接着層および上記遮光部を形成可能なものであって、後述するエネルギー照射工程において照射されるエネルギーを透過させることが可能なものであれば、特に限定されるものではなく、例えばガラス、石英等の無機材料、およびプラスチックで代表される有機材料等を用いることができる。また、基材の可撓性等は最終的に得られる細胞培養基板の種類や用途等によって適宜選択される。

#### 【0079】

##### (2) エネルギー照射工程

次に、本実施態様のエネルギー照射工程について説明する。本実施態様におけるエネルギー照射工程は、上記パターンニング用基板に上記基材側からエネルギーを照射し、上記細胞接着材料が分解または変性された細胞接着阻害部と、上記細胞接着阻害部以外の細胞接着部とからなるパターンを形成する工程である。

#### 【0080】

本工程においては、上記パターンニング用基板の基材側からエネルギーを照射し、細胞接着材料が分解または変性されて細胞との接着性が低下した細胞接着阻害部と、エネルギーが未照射であるため細胞接着材料が残存し、細胞との接着性が良好な細胞接着部とを形成可能であれば、そのエネルギーの照射方法等は特に限定されるものではない。この際、細胞接着阻害部には、光触媒、および細胞接着材料の分解物や変性物等が含有されることとなる。

#### 【0081】

本実施態様においては、通常、基材側から全面にエネルギーを照射し、上記遮光部が形成されていない領域を細胞接着阻害部、上記遮光部が形成されている領域を細胞接着部とする。なお、上記遮光部の形状より、目的とする細胞接着部の形状が広い場合には、例えばフォトマスク等を用いてエネルギーを照射し、目的とする領域のみの細胞接着材料を分解または変性させて細胞接着阻害部を形成することができる。

#### 【0082】

また、本工程においては、例えば後述する細胞接着工程で用いられる細胞および培養液を含有する細胞培養液中で、エネルギー照射が行われてもよい。この場合、後述する細胞接着工程と、エネルギー照射工程とを同一の装置内等で行うことができ、細胞培養基板の製造効率を良いものとすることができる。なお、この際上記パターンニング用基板を細胞培養液中に全て浸してエネルギー照射を行ってもよいが、本実施態様においては、特に上記パターンニング用基板の光触媒含有細胞接着層のみ、細胞培養液と接触させることが好ましい。これにより、照射されたエネルギーの透過効率を良いものとすることができ、効率よく細胞培養基板を製造することができるからである。ここで、光触媒含有層細胞接着層と細胞培養液とを接触させるとは、光触媒含有細胞接着層表面を細胞培養液と接触させるだけでなく、光触媒含有層細胞接着層全てを細胞培養液中に浸すことも含むものとする。

#### 【0083】

また、本実施態様でいうエネルギー照射（露光）とは、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞接着材料を分解または変性させることが可能ないかなるエネルギー線の照射をも含む概念であり、光の照射に限定されるものではない。

#### 【0084】

通常このようなエネルギー照射に用いられる光の波長は、400nm以下の範囲、好ましくは380nm以下の範囲から設定される。これは、上述したように光触媒として用いられる好ましい光触媒が二酸化チタンであり、この二酸化チタンにより光触媒作用を活性化させるエネルギーとして、上述した波長の光が好ましいからである。

#### 【0085】

なお、上述した可視光応答型の光触媒を用いる場合には、エネルギー照射の際、光の波長が400nmを超えるものも用いることができる。

#### 【0086】

このようなエネルギー照射に用いることができる光源としては、水銀ランプ、メタルハライドランプ、キセノンランプ、エキシマランプ、その他種々の光源を挙げることができる。ここで、上述したように、基材が細胞接着部と同じパターン状に遮光部を有する場合には、基材側からエネルギーを全面に照射することにより、行うことができる。

#### 【0087】

また、上述したような光源を用いる方法の他、エキシマ、YAG等のレーザを用いてパターン状に描画照射する方法を用いることも可能である。

#### 【0088】

エネルギー照射に際してのエネルギーの照射量は、光触媒の作用によって細胞接着材料が分解または変性されるのに必要な照射量とする。

#### 【0089】

この際、光触媒が含有される光触媒含有細胞接着層を加熱しながらエネルギー照射することにより、感度を上昇させることが可能となり、効率的に細胞接着材料を分解または変性させることができる点で好ましい。具体的には30℃～80℃の範囲内で加熱することが好ましい。

#### 【0090】

### （3）細胞接着工程

次に、本実施態様における細胞接着工程について説明する。本実施態様の細胞接着工程は、細胞および培養液を含有する細胞培養液中で、上記細胞接着部に上記細胞を接着させる工程である。

#### 【0091】

上記エネルギー照射工程により細胞接着部および細胞接着阻害部が形成されていることから、細胞およびその培養液を含有する細胞培養液中に、細胞接着層を浸すこと等によって、細胞接着部のみに細胞を接着させることができるのである。本実施態様においては、上記細胞培養液中で、細胞を接着させることができ、目的とするパターン状に細胞を培養することができるのである。

#### 【0092】

このような細胞培養液に用いられる細胞としては、例えば、神経組織、肝臓、腎臓、脾臓、血管、脳、軟骨等、血球系等の非接着性細胞以外なら、生体に存在するあらゆる組織とそれに由来する細胞とすることができる。また一般的に非接着性の細胞についても、近年、接着固定を行う為に細胞膜を修飾する技術が考案されており、必要に応じてこのような技術を用いることで本実施態様に用いることが可能である。

#### 【0093】

ここで、上述したような各組織は種々の機能をもつ細胞により形成されていることから、所望する細胞を選択し、使用する必要がある。例えば肝臓の場合、肝実質細胞以外にも上皮細胞、内皮細胞、クッパー細胞、繊維芽細胞、脂肪摂取細胞等から形成されることとなる。なおこの場合、細胞の種類により細胞接着材料に対する接着性が異なる為、細胞種に応じて、上記光触媒含有細胞接着層に用いられる細胞接着材料やその組成比の選択が必



要となる。

#### 【0094】

このような細胞の含有量は、細胞の種類等により適宜選択されるものであるが、通常細胞培養液中に $10^4$ 個/ml $\sim 10^8$ 個/ml、中でも $10^5$ 個/ml $\sim 10^7$ 個/mlの範囲内含有されていることが好ましい。これにより、上記細胞接着部上に効率よく細胞を接着させることができるからである。

#### 【0095】

また、本工程に用いられる培養液は、上記細胞の種類に応じて適宜選択されるものであり、例えば、「組織培養の技術 第三版 基礎編」p3 $\sim$ p5（日本組織培養学会編集）に記載されている培養液（培地）等を用いることができる。また、イーグル培地、フィッシャー培地など市販品を用いることもできる。

#### 【0096】

ここで、本工程を行う際には、上記細胞培養液中の温度やpHが一定に保たれていることが好ましい。これにより、細胞の死滅を防ぐことができるからである。

#### 【0097】

また、本工程において上記細胞接着部上に細胞を接着させる間、上記細胞接着阻害部に連続的、または断続的にエネルギーを照射してもよい。これにより、上記光触媒含有細胞接着層中に含有される光触媒の作用によって、細胞接着阻害部上に付着した細胞等を除去すること等ができ、細胞接着部のみに、高精細なパターン状に細胞を接着させることができるからである。ここで、照射されるエネルギーは、光触媒の作用により細胞接着阻害部上に付着した細胞等を除去すること等が可能なエネルギーであれば、特に限定されるものではなく、上記エネルギー照射工程で照射されるエネルギーと同様とすることができる。また、上記細胞接着部の形状と遮光部との形状が同じである場合には、この場合においても、上記基材側から全面にエネルギーを照射することによって、細胞接着阻害部上の細胞を除去することが可能となるのである。

#### 【0098】

##### （4）その他

本実施態様の細胞培養基板の製造方法においては、上記各工程以外に、必要に応じて適宜他の工程を有していてもよく、例えば、上記細胞接着工程後、基材側から上記細胞接着阻害部にエネルギーを照射することにより、上記細胞接着部に接着した上記細胞のパターンを維持する細胞パターン維持工程を行ってもよい。これにより、細胞接着部工程後、細胞が分泌したたんぱく質や、細胞それ自体等が、細胞接着阻害部上に付着した場合等であっても、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によりこれらの細胞を除去することができるからである。

#### 【0099】

上記細胞パターン維持工程は、基材側からエネルギーを照射し、上記細胞接着部上に付着した細胞等を除去することが可能な方法であれば、そのエネルギーの照射方法等は特に限定されるものではなく、例えば上記細胞培養液と細胞接着層が接触した状態で行ってもよく、また細胞が接着した細胞培養基板を、細胞培養液から引き上げた後、行うものであってもよい。

#### 【0100】

ここで、上記細胞パターン維持工程におけるエネルギー照射の方法等については、上記エネルギー照射工程と同様とすることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。

#### 【0101】

##### 2. 第2実施態様

次に、本発明の細胞培養基板の製造方法の第2実施態様について説明する。本発明の細胞培養基板の製造方法の第2実施態様は、基材上に、遮光部および、上記遮光部を覆うように、細胞と接着性を有し、かつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層を形成し、パターンニング用基板とするパターンニング用基板形成工程と、

上記パターンニング用基板に上記基材側からエネルギーを照射し、上記細胞接着材料が分解または変性された細胞接着阻害部と、上記細胞接着阻害部以外の細胞接着部とからなるパターンを形成するエネルギー照射工程と、

細胞および培養液を含有する細胞培養液中で、上記細胞接着部に上記細胞を接着させる細胞接着工程と

を有するものであって、上記パターンニング用基板形成工程が、上記基材上に、少なくとも光触媒を含有する光触媒含有層および上記遮光部を形成し、上記光触媒含有層上に上記細胞接着層を形成し、パターンニング用基板とする工程であるものである。

#### 【0102】

本実施態様は、例えば図2に示すように、まず、基材1上に遮光部2を形成し、その遮光部2を覆うように、光触媒を含有する光触媒含有層9を形成し、その光触媒含有層9上に細胞接着層10を形成してパターンニング用基板とするパターンニング用基板形成工程を行う(図2(a))。続いて、上記パターンニング用基板の基材1側からエネルギー4を照射し(図2(b))、光触媒含有層9に含有される光触媒の作用によって細胞接着層10中に含有される細胞接着材料が分解または変性されて細胞との接着性が低下した細胞接着阻害部5と、エネルギー4が未照射の領域であり、細胞との接着性が良好な細胞接着部6とからなるパターンを形成する(図2(c))エネルギー照射工程を行う。次に、細胞および培養液を含有する細胞培養液7中で、上記細胞接着部6に細胞8を接着させる細胞接着工程(図2(d))を行うことにより、細胞接着部6のみに高精細に細胞8が接着された細胞培養基板を製造することができるのである。

#### 【0103】

なお、上記パターンニング用基板形成工程においては、例えば図3に示すように、基材1上に光触媒含有層9を形成し、その光触媒含有層9上に遮光部2を形成した後、その遮光部2を覆うように細胞接着層10を形成してもよい。

#### 【0104】

本実施態様においては、細胞接着材料を含有する細胞接着層および、光触媒を含有する光触媒含有層が別々に形成されることから、エネルギー照射工程等において、基材側からエネルギーが照射された場合、上記光触媒含有層中の光触媒が励起されて、隣接する細胞接着層中の細胞接着材料を分解または変性させることとなるのである。本実施態様によれば、細胞接着工程により接着される細胞は、上記細胞接着層上に接着されることとなるため、直接細胞と光触媒とが接触する可能性が少なく、経時で細胞が光触媒の影響を受ける可能性を低いものとすることができる、という利点を有する。さらに、この実施態様においては、光触媒材料と直接混合することが不可能であったり、極めて高価であったりする細胞接着材料を用いることが可能となる。以下、本実施態様の細胞培養基板の製造方法における各工程ごとに説明する。

#### 【0105】

##### (1) パターンニング用基板形成工程

まず、本実施態様におけるパターンニング用基板形成工程について説明する。本実施態様におけるパターンニング用基板形成工程は、基材上に、少なくとも光触媒を含有する光触媒含有層および上記遮光部を形成し細胞と接着性を有し、かつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層を形成し、パターンニング用基板とする工程である。

#### 【0106】

本実施態様においては、上記パターンニング用基板を形成することが可能であれば、そのパターンニング用基板の構成等は特に限定されるものではなく、上述したように、基材上に遮光部を形成し、その遮光部を覆うように光触媒含有層を形成し、その光触媒含有層上に細胞接着層を形成し、パターンニング用基板としてもよく、また基材上に光触媒含有層を形成し、その光触媒含有層上に遮光部を形成し、その遮光部を覆うように細胞接着層を形成し、パターンニング用基板としてもよい。どちらの場合においても、後述するエネルギー照射工程で基材側からエネルギーが照射された際に、遮光部が形成された領域上には光触媒

含有層中の光触媒の作用を及ばないものとすることができ、この領域を細胞接着部とすることができるからである。なお、上記遮光部は、基材の、上記光触媒含有層および細胞接着層が形成される面と反対側の面に形成されていてもよい。

#### 【0107】

以下、本工程により形成されるパターンニング用基板の各構成ごとに説明する。なお、本実施態様に用いられる基材および遮光部やプライマー層等については、上述した第1実施態様と同様であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

#### 【0108】

（細胞接着層）

まず、本工程により形成される細胞接着層について説明する。本工程により形成される細胞接着層は、少なくとも細胞との接着性を有する細胞接着材料を有する層である。

#### 【0109】

具体的な細胞接着材料としては、第1実施態様で説明した光触媒含有細胞接着層に用いられる細胞接着材料と同様のものを用いることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。また、本工程により形成される細胞接着層にも、第1実施態様の光触媒含有細胞接着層で説明した細胞接着阻害性を有する材料が含有されていることが好ましい。これにより、後述するエネルギー照射工程でエネルギー照射された領域である細胞接着阻害部の細胞との接着性を低いものとするのが可能となるからである。

#### 【0110】

また、このような細胞接着層の形成は、上記細胞接着材料を含有する細胞接着層形成用塗工液を、一般的な塗布方法により塗布すること等により行うことができ、第1実施態様で説明した光触媒含有細胞接着層の形成方法と同様とすることができるので、ここでの説明は省略する。

#### 【0111】

また、本実施態様においては、後述する光触媒含有層を形成した後、細胞接着層を形成する際、例えば細胞接着材料が含有されている細胞接着材料含有液中に、上記光触媒含有層を浸して、吸着法によりその光触媒含有層上に細胞接着層を形成してもよい。本実施態様においては、後述するエネルギー照射工程を液中で行うことが可能であり、また細胞接着工程は、細胞培養液中で行われる。したがって、例えば細胞接着材料として、乾燥等に弱い材料や酸素に弱い材料等を用いた場合であっても、エネルギー照射工程をこの細胞接着材料含有液中や細胞培養液中で行い、その後細胞接着工程を行うことにより、細胞培養基板製造中に細胞接着材料が乾燥したり変性したりすること等を防ぐことができ、目的とする細胞をパターン状に接着させることが可能となるからである。

#### 【0112】

このような細胞接着材料含有液中で細胞接着層の形成を行うことが好ましい細胞接着材料としては、例えばタンパク質など乾燥によって機能が低下する材料が挙げられる。例えば、コラーゲン、フィブロンectin、γ-グロブリン等が挙げられる。また、細胞接着材料含有液に用いられる溶媒としては、例えば水、アルコール、エチレングリコール、酸、緩衝液、培地等が挙げられる。

#### 【0113】

なお、本工程により形成される細胞接着層の膜厚は、細胞培養基板の種類等によって適宜選択されるものであるが、通常 $0.001\mu\text{m}\sim 1.0\mu\text{m}$ 程度、中でも $0.005\mu\text{m}\sim 0.1\mu\text{m}$ 程度とすることができる。

#### 【0114】

（光触媒含有層）

次に、本工程により形成される光触媒含有層について説明する。本工程により形成される光触媒含有層は、少なくとも光触媒を含有する層であれば、特に限定されるものではなく、光触媒のみからなる層であってもよく、またバインダ等、他の成分を含有する層等であってもよい。

#### 【0115】

本実施態様で用いられる光触媒としては、第1実施態様における光触媒含有細胞接着層に用いられるものと同様とすることができ、本実施態様においても特に酸化チタンが用いられることが好ましい。

#### 【0116】

ここで、光触媒のみからなる光触媒含有層を形成する場合には、上記細胞接着層中の細胞接着材料の分解または変性に対する効率が向上し、処理時間の短縮化等のコスト面で有利である。一方、光触媒とバインダとからなる光触媒含有層を形成する場合には、光触媒含有層の形成が容易であるという利点を有する。

#### 【0117】

光触媒のみからなる光触媒含有層の形成方法としては、例えば、スパッタリング法、CVD法、真空蒸着法等の真空製膜法を用いる方法を挙げることができる。真空製膜法により光触媒含有層を形成することにより、均一な膜でかつ光触媒のみを含有する光触媒含有層とすることが可能であり、これにより細胞接着材料を均一に分解または変性させることが可能であり、かつ光触媒のみからなることから、バインダを用いる場合と比較して効率的に細胞接着材料を分解または変性させることが可能となる。

#### 【0118】

また、光触媒のみからなる光触媒含有層の形成方法の他の例としては、例えば光触媒が二酸化チタンの場合は、基材上に無定形チタニアを形成し、次いで焼成により結晶性チタニアに相変化させる方法等が挙げられる。ここで用いられる無定形チタニアとしては、例えば四塩化チタン、硫酸チタン等のチタンの無機塩の加水分解、脱水縮合、テトラエトキシチタン、テトライソプロポキシチタン、テトラ-n-プロポキシチタン、テトラブトキシチタン、テトラメトキシチタン等の有機チタン化合物を酸存在下において加水分解、脱水縮合によって得ることができる。次いで、400℃～500℃における焼成によってアナターゼ型チタニアに変性し、600℃～700℃の焼成によってルチル型チタニアに変性することができる。

#### 【0119】

また、バインダを用いる場合は、バインダの主骨格が上記の光触媒の光励起により分解されないような高い結合エネルギーを有するものが好ましく、例えばこのようなバインダとしては、上述した細胞接着層の項で説明したオルガノポリシロキサン等を挙げることができる。

#### 【0120】

このようにオルガノポリシロキサンをバインダとして用いた場合は、上記光触媒含有層は、光触媒とバインダであるオルガノポリシロキサンを必要に応じて他の添加剤とともに溶剤中に分散して塗布液を調製し、この塗布液を基材上に塗布することにより形成することができる。使用する溶剤としては、エタノール、イソプロパノール等のアルコール系の有機溶剤が好ましい。塗布はスピンコート、スプレーコート、ディップコート、ロールコート、ブレードコート、ダイコート等の公知の塗布方法により行うことができる。バインダとして紫外線硬化型の成分を含有している場合、紫外線を照射して硬化処理を行うことにより光触媒含有層を形成することができる。

#### 【0121】

また、バインダとして無定形シリカ前駆体を用いることができる。この無定形シリカ前駆体は、一般式 $SiX_4$ で表され、Xはハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、またはアセチル基等であるケイ素化合物、それらの加水分解物であるシラノール、または平均分子量3000以下のポリシロキサンが好ましい。

#### 【0122】

具体的には、テトラエトキシシラン、テトライソプロポキシシラン、テトラ-n-プロポキシシラン、テトラブトキシシラン、テトラメトキシシラン等が挙げられる。また、この場合には、無定形シリカの前駆体と光触媒の粒子とを非水性溶媒中に均一に分散させ、透明基材上に空気中の水分により加水分解させてシラノールを形成させた後、常温で脱水縮重合することにより光触媒含有層を形成できる。シラノールの脱水縮重合を100℃以

上で行えば、シラノールの重合度が増し、膜表面の強度を向上できる。また、これらの結着剤は、単独あるいは２種以上を混合して用いることができる。

#### 【０１２３】

光触媒含有層中の光触媒の含有量は、５～６０重量％、好ましくは２０～４０重量％の範囲で設定することができる。また、光触媒含有層の厚みは、０．０５～１０μmの範囲内が好ましい。

#### 【０１２４】

また、光触媒含有層には上記の光触媒、バインダの他に、上述した細胞接着層に用いられる界面活性剤等を含有させることもできる。

#### 【０１２５】

ここで、本実施態様においては上記光触媒含有層は、その表面は細胞との接着性が、例えば表面が高い親水性を有すること等によって細胞との接着性が低いことが好ましい。これにより、後述するエネルギー照射工程において、上記細胞接着層が分解等されて光触媒含有層が露出した場合に、その領域を細胞との接着性が低い領域とすることができるからである。

#### 【０１２６】

##### （２）エネルギー照射工程

本実施態様におけるエネルギー照射工程は、上記パターンニング用基板に基材側からエネルギーを照射し、上記細胞接着材料が分解または変性された細胞接着阻害部と、上記細胞接着阻害部以外の細胞接着部とからなるパターンを形成する工程である。

#### 【０１２７】

本工程においては、上記パターンニング用基板の基材側からエネルギーを照射し、細胞接着材料が分解または変性されて細胞との接着性が低下した細胞接着阻害部と、エネルギーが未照射であるため細胞接着材料が残存し、細胞との接着性が良好な細胞接着部とを形成可能であれば、そのエネルギーの照射方法等は特に限定されるものではない。この際、例えば上記細胞接着材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解されるものである場合には、細胞接着阻害部中にはその細胞接着材料が少量含有されている、または細胞接着材料の分解物等が含有されている、もしくは細胞接着層が完全に分解除去されて光触媒含有層が露出すること等となる。また、上記細胞接着材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により変性されるものである場合には、細胞接着阻害部中にはその変性物等が含有されていることとなる。

#### 【０１２８】

本実施態様においても、通常、基材側から全面にエネルギーを照射し、上記遮光部が形成されていない領域を細胞接着阻害部、上記遮光部が形成されている領域を細胞接着部とする。なお、上記遮光部の形状より、目的とする細胞接着部の形状が広い場合には、例えばフォトマスク等を用いてエネルギーを照射し、目的とする領域のみの細胞接着材料を分解または変性させて細胞接着阻害部を形成することができる。

#### 【０１２９】

また、本工程は上述したように、細胞接着材料を含有する細胞接着材料含有液中や、後述する細胞接着工程で用いられる細胞および培養液を含有する細胞培養液中で、エネルギー照射が行われてもよい。なお、この際上記パターンニング用基板を全て細胞培養液中に浸してエネルギー照射を行っても良いが、本実施態様においては、上記パターンニング用基板の基材を細胞培養液と接触させないことが好ましい。これにより、照射されたエネルギーの透過効率を良いものとすることができ、効率よく細胞培養基板を製造することができるからである。

#### 【０１３０】

なお、本工程において照射するエネルギーの種類や、照射方法等については、上述した第１実施態様のエネルギー照射工程と同様とすることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。

#### 【０１３１】

### （３）細胞接着工程

次に、本実施態様における細胞接着工程について説明する。本実施態様の細胞接着工程は、細胞および培養液を含有する細胞培養液中で、上記細胞接着層における細胞接着部に、細胞を接着させる工程である。

#### 【０１３２】

本実施態様における細胞接着工程については、上記第１実施態様における細胞接着工程と同様とすることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。なお、本実施態様においても、上記細胞接着部上に細胞を接着させる際、細胞接着阻害部にエネルギーを照射してもよい。

#### 【０１３３】

### （４）その他

本実施態様においても、上記各工程以外に、必要に応じて適宜他の工程を有していてもよく、例えば、上記細胞接着工程後、上記基材側から上記細胞接着阻害部にエネルギーを照射することにより、上記細胞接着部に接着した上記細胞のパターンを維持する細胞パターン維持工程を行ってもよい。これにより、細胞接着部工程後、たんぱく質や細胞が細胞接着阻害部上に付着した場合等であっても、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によりこれらの細胞を除去することができるからである。

#### 【０１３４】

なお、上記細胞パターン維持工程についても、上記第１実施態様と同様とすることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。

#### 【０１３５】

### B．細胞培養基板製造装置

次に、本発明の細胞培養基板製造装置について説明する。本発明の細胞培養基板製造装置は、基板を支持する基板支持部と、上記細胞および培養液を含有する細胞培養液を保持し、かつ上記細胞培養液のpHを維持するpH調整手段および上記細胞培養液の温度を維持する温度調整手段を有する細胞培養液保持部と、上記基板にエネルギーを照射するエネルギー照射部とを有することを特徴とするものである。

#### 【０１３６】

本発明の細胞培養基板製造装置は、例えば図４に示すように、基板２１を支持する基板支持部２２と、細胞培養液７を保持する細胞培養液保持部２３と、基板にエネルギーを照射するエネルギー照射部２４とを有するものであって、上記細胞培養液保持部２３には、細胞培養液７中のpHを維持するpH調整手段（図示略）および、細胞培養液７中の温度を維持する温度調整手段（図示略）を有するものである。

#### 【０１３７】

本発明によれば、上記細胞培養基板製造装置が、上記細胞培養液保持部、基板支持部、およびエネルギー照射部を有することから、例えば光触媒を含有する層等を用いて、細胞培養液中で細胞を培養する際、基板の細胞を培養する領域以外の領域に付着したたんぱく質や細胞をエネルギー照射により除去すること等ができ、高精細なパターン状に細胞が培養された細胞培養基板を製造することが可能な、細胞培養基板製造装置とすることができる。

#### 【０１３８】

ここで、本発明に用いられる基板としては、基材と、その基材上に形成された遮光部と、基材上に上記遮光部を覆うように形成され、細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層とを有するパターンニング用基板であることが好ましい。これにより、基板支持部に上記パターンニング用基板を支持させて、基材側からエネルギー照射部によってエネルギーを照射することにより、遮光部が形成されていない領域にのみエネルギーを照射することができ、細胞接着層中の細胞接着材料が分解または変性された細胞接着阻害部と、それ以外の領域である細胞接着部からなるパターンを形成することができる。続いて、この細胞接着層を、上記細胞培養液保持部における細胞培養液中に浸すことにより、細胞を細胞接着部上にのみ

付着させることができ、目的とするパターン状に細胞を培養することができるからである。なお、上記エネルギー照射は、細胞接着層を細胞培養液中に浸した状態で行ってもよく、また細胞培養液に浸さない状態で、行ってもよい。

#### 【0139】

本発明においては、上記細胞培養液保持部と、エネルギー照射部とが、一つの装置内に含まれていることから、上記細胞培養液中で細胞を接着させる際や、細胞を接着させた後、上記細胞接着阻害部にエネルギーを照射することができることから、細胞接着阻害部にたんばく質や細胞が付着した場合であっても、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により細胞等を除去することが可能となり、細胞接着部上にのみ、高精細に細胞を接着させることができるのである。

以下、本発明の細胞培養基板製造装置の各構成ごとに説明する。

#### 【0140】

##### 1. 基板支持部

まず、本発明の細胞培養基板製造装置における基板支持部について説明する。本発明における基板支持部は、基板を支持することが可能なものであれば、特に限定されるものではなく、自在に基板の高さや位置を調整するものとするのが好ましい。

#### 【0141】

また、この基板支持部には、基板の温度を維持する温度調整手段等が設けられていてもよい。これにより、細胞接着部上に接着した細胞の活性を保つこと等が可能となり、高品質な細胞培養基板を製造することができるからである。

#### 【0142】

##### 2. 細胞培養液保持部

次に、本発明の細胞培養基板製造装置における細胞培養液保持部について説明する。本発明における細胞培養液保持部は、細胞および培養液を含有する細胞培養液を保持し、かつ上記細胞培養液のpHを維持するpH調整手段および上記細胞培養液の温度を維持する温度調整手段を有するものであれば、特に限定されるものではなく、必要に応じて攪拌手段等を有するものであってもよい。

#### 【0143】

本発明においては、上記細胞培養液を保持する細胞培養液保持部に、上記pH調整手段や温度調整手段が設けられていることから、細胞培養液中のpHや温度を一定に保つことができ、細胞が死滅したり活性が悪くなることを防止することができるのである。このようなpH調整手段としては、一般的な細胞培養装置において、pH調整手段として用いられているものを用いることが可能であるので、ここでの説明は省略する。また、温度調整手段についても、上記細胞培養液保持部中の細胞培養液の温度を維持することが可能なものであれば、一般的な細胞培養装置において、温度調整手段として用いられているものを用いることが可能であるので、ここでの説明は省略する。

#### 【0144】

##### 3. エネルギー照射部

次に、本発明の細胞培養基板製造装置におけるエネルギー照射部について説明する。本発明におけるエネルギー照射部は、上記基板支持部により支持されている基板に、例えば光触媒を含有する層を用いてエネルギーを照射し、エネルギー照射された領域の細胞を除去等して、細胞のパターンを維持すること等が可能なものであれば特に限定されるものではなく、特に上述したパターンニング用基板の上記細胞接着層に含有される細胞接着材料を光触媒の作用により、分解または変性することが可能なものであることが好ましい。

#### 【0145】

このようなエネルギー照射に用いることができる光源としては、光触媒を活性化させることが可能なものであれば、特に限定されるものではなく、例えば水銀ランプ、メタルハライドランプ、キセノンランプ、エキシマランプ、その他種々の光源を挙げることができる。また、エキシマ、YAG等のレーザ等を光源とするものであってもよい。これらの光源を用いることにより、光触媒を励起させることができ、上記細胞接着部を形成すること

ができるからである。

#### 【0146】

##### 4. 細胞培養基板製造装置

本発明の細胞培養基板製造装置は、上記基板支持部、細胞培養液保持部、エネルギー照射部を有するものであれば、特に限定されるものではなく、必要に応じて適宜必要な部材を有していてもよい。また、本発明の細胞培養基板製造装置は、上述した「A. 細胞培養基板の製造方法」等に用いられることが好ましい。

#### 【0147】

なお、本発明は上記実施形態に限定されるものではない。上記実施形態は、例示であり、本発明の特許請求の範囲に記載された技術的思想と実質的に同一な構成を有し、同様な作用効果を奏するものは、いかなるものであっても本発明の技術的範囲に包含される。

#### 【実施例】

#### 【0148】

以下に実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。

#### 【0149】

##### <実施例1>

(ランプ付きインキュベータの作製)

市販のpH調整機能ならびに温度調整機能のついたインキュベータを改造し、天井部分に水銀ランプを設置しタイマー付き電源をインキュベータの外部に取り付けた。また、上記細胞培養用基板を四隅で支えることができる高さ調整可能な治具を天井に設置した。さらに、5%CO<sub>2</sub>95%Airのレギュレータ付きポンペを流量計を介してインキュベータに接続した。

#### 【0150】

##### [パターンニング用基板形成工程]

(光触媒含有層の形成)

イソプロピルアルコール3g、オルガノシランTSL8114(GE東芝シリコン)0.4g、光触媒無機コーティング剤ST-K01(石原産業)1.5gを混合し、攪拌しながら20分間、100℃で加温した。

一般的なクロムマスクを作製する手順により、遮光部80μm開口部300μmのストライプ状遮光層を基板の表面に設けた3cm角の石英ガラス基板を作製した。この石英ガラス基板表面に上記光触媒コーティング液をスピンコーティング法により塗布し、その基板を150℃の温度で10分間乾燥することにより、加水分解、重縮合反応を進行させ、光触媒がオルガノポリシロキサン中に強固に固定された膜厚0.2μmの光触媒含有層を基板上に形成した。

#### 【0151】

(細胞接着材料含有層の形成)

フィブロネクチンF-4759(シグマ)0.2mg、純水200mlとを混合し、この水溶液を先に光触媒含有層を設けた基板の光触媒層に対し、基板面積1cm<sup>2</sup>当たり300μlの比率で滴下し、これを4℃下で24時間静置した。更に基板をPBSにて2回洗浄し、基板上に光触媒含有層と細胞接着材料含有層を有するパターンニング用基板を得た。当該基板はPBSに漬けた状態で速やかに次の工程に移した。

#### 【0152】

##### [エネルギー照射工程]

シャーレにPBSを注ぎ、上記パターンニング用基板をインキュベータ内の治具でフィブロネクチン吸着面を下にして支え、フィブロネクチン吸着面をシャーレ内のPBSに浸した。天井の水銀ランプにより6J/cm<sup>2</sup>(測定波長254nm)の紫外線露光を行い、未露光部が細胞接着性で露光部が細胞接着阻害性にパターン化された細胞接着性表面を有する細胞培養用基板を得た。

#### 【0153】

##### [細胞接着工程]



各種組織に由来する細胞の培養実験手順については、例えば“組織培養の技術 第三版 基礎編”、日本組織培養学会編、朝倉書店等にその詳細が述べられている。本出願においては、ラット肝実質細胞を用いて基板を評価した。

ラットより摘出した肝臓をシャーレに移してメスで5mm大に細分し、20mlのDME M培地を加えてピペットで軽く懸濁した後、細胞濾過器で濾過した。得られた粗分散細胞浮遊液を500～600rpmで90秒間遠心処理し、上清を吸引して除去した。残留した細胞に新たにDME M培地を加えて再び遠心処理した。この操作を3回繰り返すことにより、ほぼ均一な肝実質細胞を得た。得られた肝実質細胞に、DME M培地20mlを加えて懸濁し、肝実質細胞懸濁液を調製した。

次にWaymouth MB752/1培地（L-グルタミン含有、 $\text{NaHCO}_3$ 非含有）（ギブコ）14.12gに蒸留水900mlを添加した。これに $\text{NaHCO}_3$  2.24g、アンホテリシンB液（ICN）10ml、ペニシリンストレプトマイシン液（ギブコ）10mlを加えて攪拌した。これをpH7.4に調整した後、全量を1000mlとし、 $0.22\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターで濾過滅菌したものをWaymouth MB752/1培地液とした。

先に作成した肝実質細胞懸濁液を、同じく作成したWaymouth MB752/1培地液に懸濁した上で、シャーレ内に置かれた上述の細胞培養用パターンニング基板上に播種した。この基板を上記インキュベータ内で殺菌灯オフ、 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ の条件下で24時間静置し、基板上全面に肝実質細胞を接着させた。

この基板をPBSで2回洗浄することで非接着細胞や死細胞を除去した。シャーレ内に新しい培地液を加え、上記の細胞接着済み基板を細胞接着面を下にして上記治具で支え培地液に細胞接着面を浸した。

培地液を交換しながら48時間まで細胞の培養を続け光学顕微鏡で細胞を観察したところ、細胞が細胞培養用パターンニング基板上の細胞接着部に沿いながら接着している事を確認した。

さらに水銀ランプを4時間当り5分照射する条件下、培地液を交換しながら1週間培養を続けたところ、細胞集合体が基板のパターンに沿って形成されていることを光学顕微鏡により確認した。

【0154】

＜実施例2＞

（ランプ付きインキュベータ）

市販のpH調整機能ならびに温度調整機能のついたインキュベータを改造し、床部分に水銀ランプを設置しタイマー付き電源をインキュベータの外部に取り付けた。インキュベータに元から備え付けられていた棚の代わりに、直径約3mmの金属ワイヤでシャーレを支える棚を作り、備え付けた。5% $\text{CO}_2$  95%Airのレギュレータ付きポンペを流量計を介してインキュベータに接続した。

【0155】

【パターンニング用基板形成工程】

（光触媒含有層の形成）

実施例1と同様の基板を用い、実施例1と同様にして行った。

【0156】

（基板付きシャーレの作製）

ポリスチレンシャーレの底面中央を直径約2.5cmで切り抜き、そこに上記の光触媒層付き基板を、貼り付けた。

【0157】

（細胞接着材料含有層の形成）

上記シャーレを用いて実施例1と同様に実施し、パターンニング用基板を形成した。

【0158】

【エネルギー照射工程】

$37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ に設定済みのインキュベータ内に、PBSの入った上記細胞接着材料付きシャーレ（パターンニング用基板）を、ワイヤ製棚にシャーレの中央部がかからないように注

意してセットした。インキュベータ床に設置された水銀ランプにより  $6 \text{ J} / \text{cm}^2$  (測定波長  $254 \text{ nm}$ ) の紫外線露光を行い、未露光部が細胞接着性で露光部が細胞接着阻害性にパターン化された細胞接着性表面を有する細胞培養用基板を得た。

【0159】

[細胞接着工程]

実施例1と同様の実験を行い、本実施例においても実施例1と同様の結果を得た。

【図面の簡単な説明】

【0160】

【図1】 本発明の細胞培養基板の製造方法の一例を示す工程図である。

【図2】 本発明の細胞培養基板の製造方法の他の例を示す工程図である。

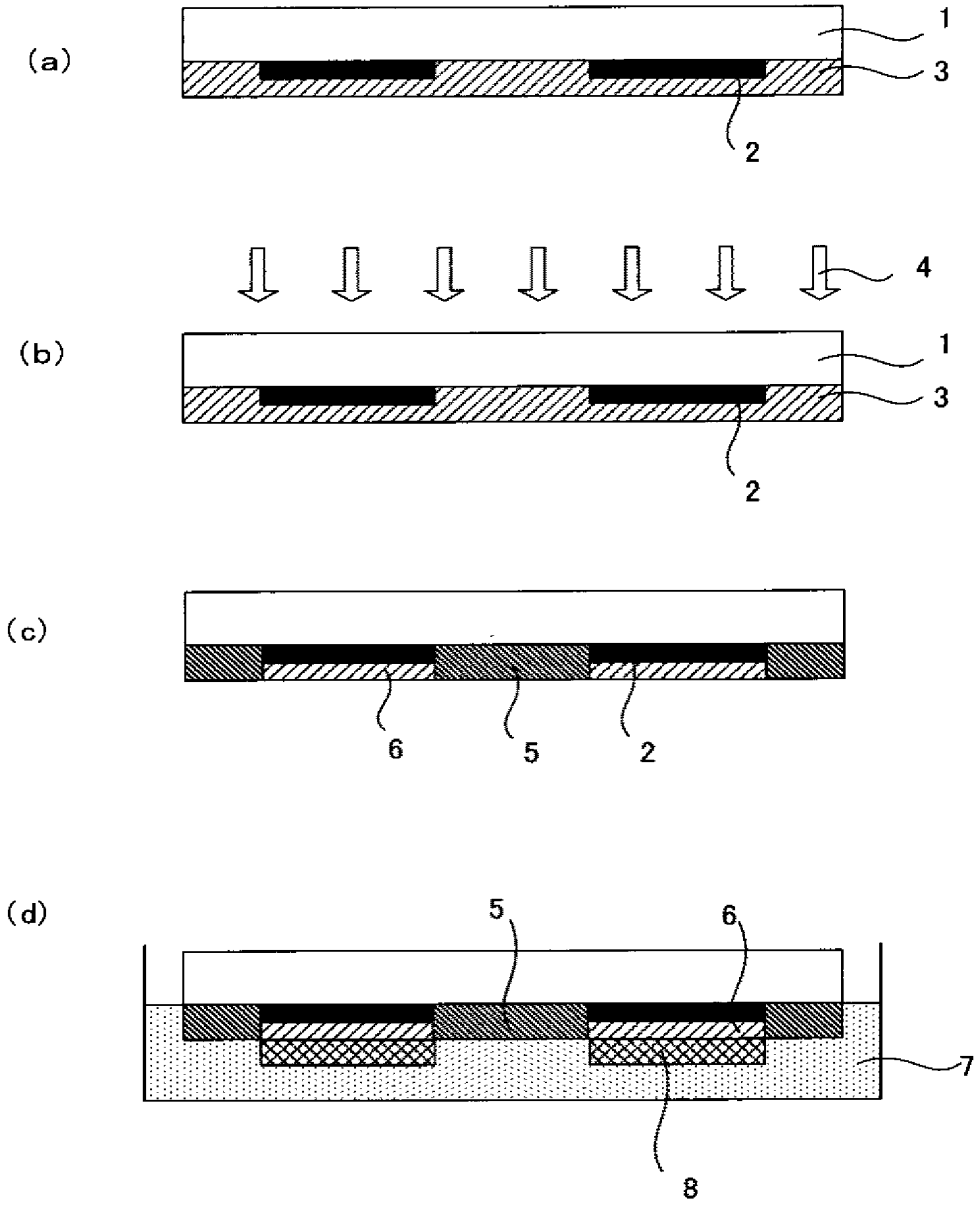
【図3】 本発明の細胞培養基板の製造方法のパターニング用基板形成工程で形成されるパターニング用基板の一例を示す概略断面図である。

【図4】 本発明の細胞培養基板製造装置の一例を示す説明図である。

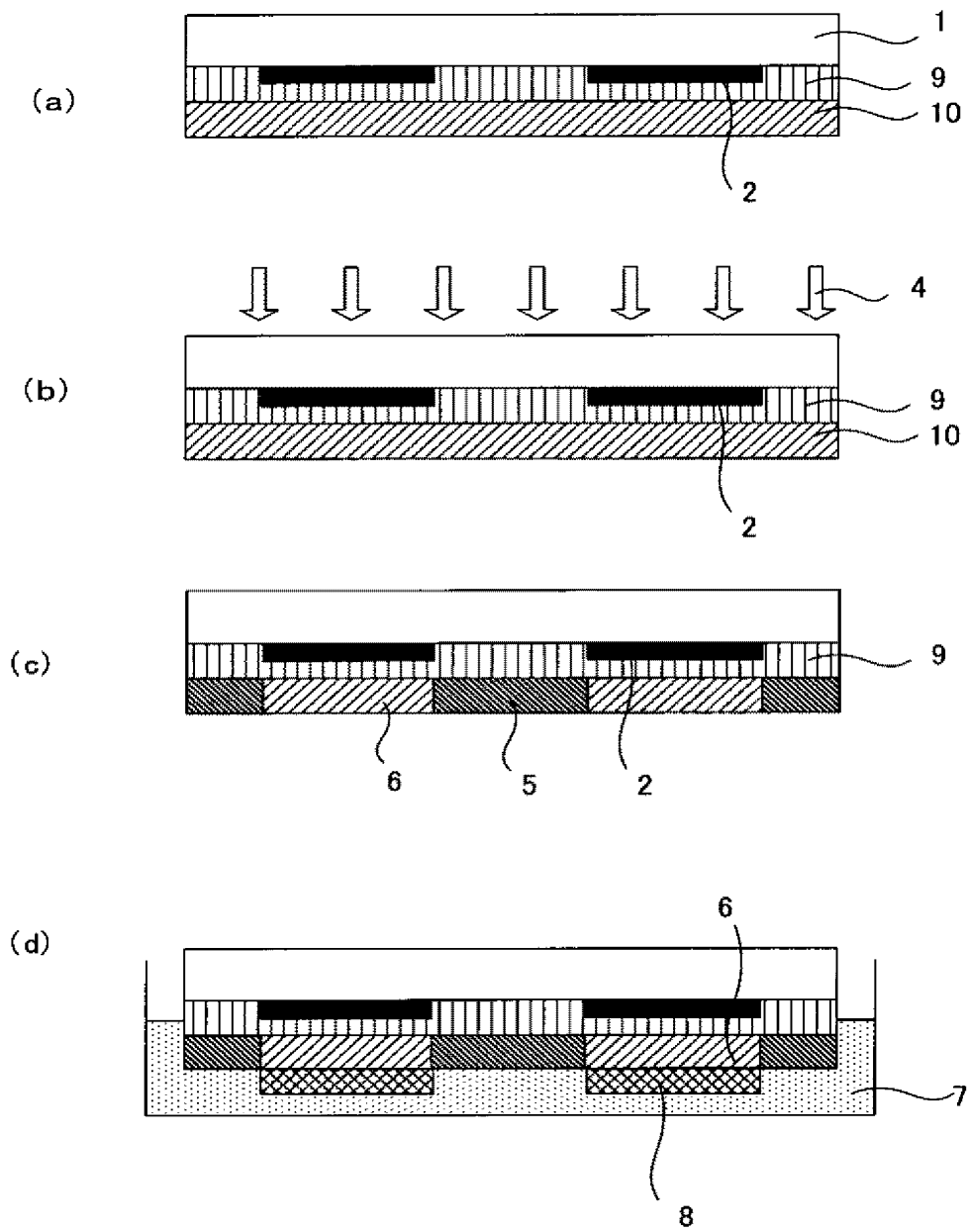
【符号の説明】

【0161】

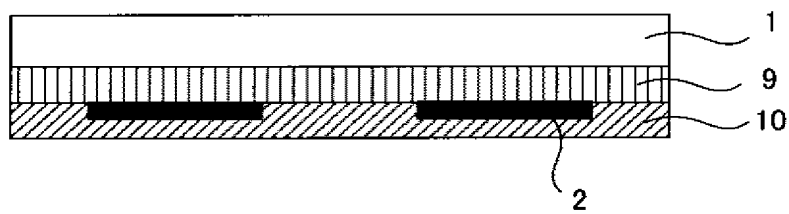
- 1 … 基材
- 2 … 細胞培養領域
- 3 … 細胞接着部
- 4 … 細胞接着補助部
- 5 … フォトマスク
- 6 … エネルギー
- 7 … 細胞培養液
- 8 … 細胞
- 9 … 光触媒含有層
- 10 … 細胞接着層
- 21 … 基板
- 22 … 基板支持部
- 23 … 細胞培養液保持部
- 24 … エネルギー照射部



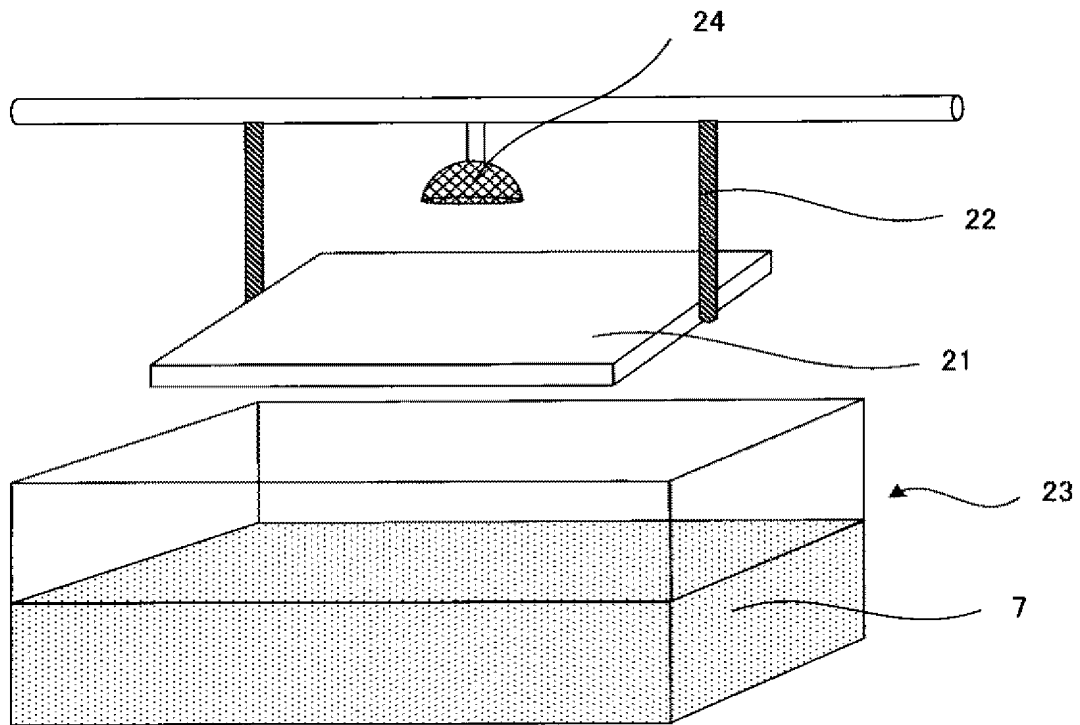
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、基材上に細胞を高精細なパターン状に接着し、長期にわたりパターンを維持しながら細胞を培養させるために用いられる細胞培養基板の新たな製造方法、およびその製造方法に用いられる製造装置を提供することを主目的としている。

【解決手段】 上記目的を達成するために、本発明は、基材上に、遮光部および、前記遮光部を覆うように、細胞と接着性を有し、かつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層を形成し、パターンニング用基板とするパターンニング用基板形成工程と、

前記パターンニング用基板に前記基材側からエネルギーを照射し、前記細胞接着材料が分解または変性された細胞接着阻害部と、前記細胞接着阻害部以外の細胞接着部とからなるパターンを形成するエネルギー照射工程と、

細胞および培養液を含有する細胞培養液中で、前記細胞接着部に前記細胞を接着させる細胞接着工程と

を有することを特徴とする細胞培養基板の製造方法を提供する。

【選択図】 図 1

【書類名】 手続補正書  
【提出日】 平成17年 5月13日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2004- 91653  
【補正をする者】  
【識別番号】 000002897  
【氏名又は名称】 大日本印刷株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100101203  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 山下 昭彦  
【電話番号】 03-5524-2323  
【手続補正1】  
【補正対象書類名】 明細書  
【補正対象項目名】 0 1 5 3  
【補正方法】 変更  
【補正の内容】  
【0 1 5 3】

#### 〔細胞接着工程〕

各種組織に由来する細胞の培養実験手順については、例えば『組織培養の技術 第三版基礎編』煤A日本組織培養学会編、朝倉書店等にその詳細が述べられている。本出願においては、ラット肝実質細胞を用いて基板を評価した。

ラットより摘出した肝臓をシャーレに移してメスで5mm大に細分し、20mlのDME M培地を加えてピペットで軽く懸濁した後、細胞濾過器で濾過した。得られた粗分散細胞浮遊液を500～600rpmで90秒間遠心処理し、上清を吸引して除去した。残留した細胞に新たにDME M培地を加えて再び遠心処理した。この操作を3回繰り返すことにより、ほぼ均一な肝実質細胞を得た。得られた肝実質細胞に、DME M培地20mlを加えて懸濁し、肝実質細胞懸濁液を調製した。

次にWaymouth MB752／1培地（L-グルタミン含有、NaHCO<sub>3</sub>非含有）（ギブコ）14.12gに蒸留水900mlを添加した。これにNaHCO<sub>3</sub> 2.24g、アンホテリシンB液（ICN）10ml、ペニシリンストレプトマイシン液（ギブコ）10mlを加えて攪拌した。これをpH7.4に調整した後、全量を1000mlとし、0.22μmのメンブレンフィルターで濾過滅菌したものをWaymouth MB752／1培地液とした。

先に作成した肝実質細胞懸濁液を、同じく作成したWaymouth MB752／1培地液に懸濁した上で、シャーレ内に置かれた上述の細胞培養用パターンニング基板上に播種した。この基板を上記インキュベータ内で殺菌灯オフ、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間静置し、基板上全面に肝実質細胞を接着させた。

この基板をPBSで2回洗浄することで非接着細胞や死細胞を除去した。シャーレ内に新しい培地液を加え、上記の細胞接着済み基板を細胞接着面を下にして上記治具で支え培地液に細胞接着面を浸した。

培地液を交換しながら48時間まで細胞の培養を続け細胞を観察したところ、細胞が細胞培養用パターンニング基板上の細胞接着部に沿いながら接着している事を確認した。

さらに水銀ランプを4時間当り5分照射する条件下、培地液を交換しながら1週間培養を続けたところ、細胞集合体が基板のパターンに沿って形成されている事を確認した。

## 出願人履歴

0 0 0 0 0 2 8 9 7

19900827

新規登録

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号  
大日本印刷株式会社